

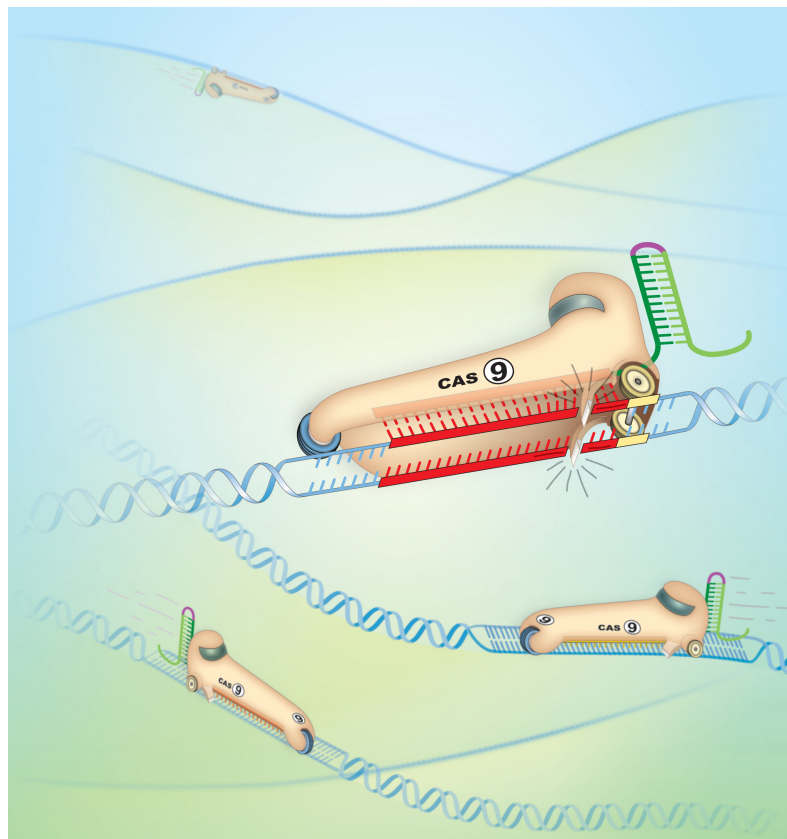
Agroinfiltration och transient uttryck av CRISPR/Cas9

– En förberedande studie på *Nicotiana benthamiana* och potatis (*Solanum tuberosum* L.)

Agroinfiltration and transient expression of CRISPR/Cas9

– A preliminary study on *Nicotiana benthamiana* and potato (*Solanum tuberosum* L.)

Niklas Olsson



Agroinfiltration och transient uttryck av CRISPR/Cas9 – En förberedande studie på *Nicotiana benthamiana* och potatis (*Solanum tuberosum* L.)

Agroinfiltration and transient expression of CRISPR/Cas9 – A preliminary study on *Nicotiana benthamiana* and potato (*Solanum tuberosum* L.)

Niklas Olsson

Handledare: Per Hofvander, SLU, Institutionen för växtförädling

Btr handledare: Mariette Andersson, SLU, Institutionen för växtförädling

Examinator: Ida Lager, SLU, Institutionen för växtförädling

Omfattning: 15 hp

Nivå och fördjupning: G2E

Kurstitel: Kandidatarbete i biologi

Kurskod: EX0493

Program/utbildning: Hortonom

Examen: Kandidatexamen i biologi

Ämne: Biologi

Utgivningsort: Alnarp

Utgivningsmånad och -år: Juni 2014

Omslagsbild: *Jennifer Doudna/UC Berkley*

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: CRISPR; Cas9; *Agrobacterium*; agroinfiltration; *Nicotiana*, potatis, *in-vivo* mutation

SLU, Sveriges lantbruksuniversitet

Fakulteten för landskapsarkitektur, trädgårds- och växtproduktionsvetenskap

Institutionen för biosystem och teknologi

Sammanfattning

Den senast utvecklade tekniken för riktade förändringar av genom *in-vivo* är baserad på CRISPR/Cas-systemet för vilket förutsättningarna i *Nicotiana benthamiana* och potatis, *Solanum tuberosum*, här undersöktes. För att föra in genkonstruktioner i växterna användes *Agrobacterium tumefaciens* som via vakuum kommer i kontakt med de inre delarna av bladen varefter de gener som finns på en binär vektor uttrycks transient. Först undersöktes de optimala parametrarna för erhållandet av ett högt transient uttryck med hjälp av ett grönt fluorescerande protein, GFP. Dessa parametrar användes sedan för att infiltrera en CRISPR/Cas-konstruktion som designats för att introducera mutationer genom att klyva ett exon i genen för granulbundet stärkelsesyntas, *GBSS*. Det visade sig under första delen av arbetet att det ej gick att erhålla transient uttryck i potatis med denna metod. Därför infiltrerades endast *N. benthamiana* med CRISPR/Cas-konstruktionen.

Abstract

The latest technology for genome editing is based on the CRISPR/Cas-system. The purpose of this study was to examine the conditions for its use in *Nicotiana benthamiana* and potato, *Solanum tuberosum*. *Agrobacterium tumefaciens* was used to deliver the gene constructs via vacuum infiltration and, inside the leaves, produce a transient expression of a binary vector. The optimal parameters for a high transient expression was first examined using a green fluorescent protein, GFP. These parameters were then used for infiltration of a CRISPR/Cas-construct designed to introduce mutations by cleavage of an exon in the gene coding for granule bound starch synthase, *GBSS*. The CRISPR/Cas-construct was infiltrated only to *N. benthamiana* due to the failure of producing a transient expression of GFP in potato.

Innehållsförteckning

1. Inledning.....	5
2. Teori.....	7
2.1 <i>Agrobacterium</i> och binära vektorer.....	7
2.2 Agroinfiltrering och tillfälligt uttryck.....	8
2.3 CRISPR/Cas9.....	8
3. Material och metod.....	10
3.1 Förberedande av bakteriestammar.....	10
3.1.1 Kompetensgörning.....	10
3.1.2 Direkt transformation.....	10
3.2 Vakuuminfiltrering.....	11
3.3 Dokumentation av GFP-uttryck.....	13
3.4 Sekvensering av målsekvens.....	13
4. Resultat.....	14
4.1 Transformation av <i>A. tumefaciens</i>	14
4.2 Undersökning av målsekvens.....	15
4.2.1 PCR av målsekvens i <i>N. benthamiana</i>	15
4.2.2 Sekvensering av målsekvens i <i>N. benthamiana</i>	16
4.2.3 PCR av behandlade plantor av <i>N. benthamiana</i>	16
4.3 GFP-uttryck vid olika behandlingar.....	17
4.3.1 <i>N. benthamiana</i>	17
4.3.2 Potatis.....	24
5. Diskussion.....	25
5.1 GFP-uttryck.....	25
5.1.1 <i>N. benthamiana</i>	25
5.1.1.1 Tid, dödlighet och Silwet L-77.....	25
5.1.1.2 Undertryck.....	25
5.1.1.3 Stam av <i>A. tumefaciens</i>	26
5.1.2 Potatis.....	27
5.2 Gruppering av sekvenser.....	27
7. Referenser.....	28
Bilagor.....	31
Bilaga 1: Skillnader i sekvenser från modersort av <i>N. benthamiana</i>	31

1. Inledning

Idag har forskarvärlden möjligheten att med hjälp av flera olika verktyg undersöka vilken roll olika gener spelar i en växt. Ett av dessa verktyg är genmodifiering som möjliggör förändringar av specifika genuttryck, till exempel kan gener slås ut eller så kan nya gener sättas in. Genmodifieringsteknikerna bygger generellt på en permanent förändring av växtens genom vilket, beroende på växtslag, kan innebära långa tidsförlopp innan effekten av förändringen kan ses. De senaste åren har nya tekniker kommit fram, ZFN och TALEN, som möjliggör riktad mutation *in-vivo*. Dessa har dock inte fått genomslag inom växtforskningen på grund av det komplicerade handhavandet med designen av unika proteinkomplex för varje inbindningsställe. Den senaste i raden av tekniker, CRISPR/Cas9, kan underlätta arbetet då systemet har hög anpassningsförmåga och antalet unika komponenter begränsas till en RNA-sekvens (Belhaj et al., 2013).

CRISPR-tekniken bygger på ett bakteriellt försvarssystem mot virus där en kort gensekvens, kopierad från viruset självt, används för att hitta och bryta ner de invaderande virusen. Systemet går att modifiera till att känna igen specifika gensekvenser hos eukaryota organismer vilket möjliggör introduktion av mutationer (Jinek et al., 2012). Tekniken har med framgång använts inom olika växtslag men då främst genom transfektion av protoplaster, växtceller utan cellväggar, där plasmid-DNA med de muterande konstruktionerna tillsätts och uttrycks transient (Shan et al., 2013; Li et al., 2013). Detta är en väldigt arbetsintensiv metod som skulle gå att komma runt genom att till exempel använda de geninförande egenskaperna hos *Agrobacterium tumefaciens*. Detta hade vidgat möjligheterna för mutation *in-vivo* men frågan är bara hur detta muterande paket ska levereras in i växten.

För erhållandet av transient uttryck genom agroinfiltration, införandet av DNA i växter med hjälp av *A. tumefaciens*, används idag huvudsakligen två metoder, spruta och vakuum. Vilken metod som är mest lämplig varierar mellan olika växtslag och experimentets mål, med sprutmetoden finns möjligheten att undersöka olika parametrar i samma blad medan vakuum kan vara bättre när mängden växtmaterial ökar (Belhaj et al., 2013). Båda metoderna är väl

beprövade med modellorganismen *Nicotiana benthamiana*, där uttryck av gener kan ses redan efter något dygn, medan framgångarna med dess släkting potatis, *Solanum tuberosum*, har varit högst begränsade (Bhaskar et al., 2009).

Målsekvensen i båda växtslagen är genen för granulbundet stärkelsesyntas (*GBSS*) och genom att introducera en mutation i denna gen hindras produktionen av amylos (Visser et al., 1989). I potatis ger detta knölar vars stärkelseprofil endast består av amylopektin vilket är en efterfrågad egenskap inom industrin (Jobling, 2004). Dessa amylofria potatisar kan fås genom att producera kallus från muterade blad och sedan regenerera skott vilka nu bär på mutationen.

I denna studie undersöktes möjligheten till *in-vivo*-mutation via agroinfiltrering. I det första steget utarbetades ett fungerande protokoll för *N. benthamiana* och potatis med hjälp av en fluorescerande rapportör och i det andra användes detta protokoll för införsel av en CRISPR/Cas9-konstruktion.

2. Teori

2.1 *Agrobacterium* och binära vektorer

För drygt 30 år sedan utvecklades transformationen av växter vilket gav forskarna ett anpassningsbart verktyg som kunde konstrueras utifrån varje situation. Genom introducerandet av det binära systemet öppnades fältet upp för transformation på bred front och *A. tumefaciens* var bakterien som möjliggjorde det hela (Lee & Gelvin, 2008). I naturen är *A. tumefaciens* en växtpatogen som inducerar tumörer hos sin värdväxt genom att föra in ett genpaket kallat T-DNA. I dessa tumörer lever och förökar sig bakterien genom att utnyttja växten som producent av specifika näringsämnen. T-DNA:t är skilt från bakteriens kromosomala DNA då det sitter på en plasmid tillsammans med *vir*-generna, vilka är ansvariga för införandet av T-DNA:t till värdväxten. Det är denna plasmid, kallad Ti-plasmiden, och dess *vir*-gener som är nyckeln vid utnyttjandet av *A. tumefaciens* vid transformation (Taiz & Zeiger, 2010).

T-DNA:t är inte begränsat till att bära gener som kodar för tumörinduktion och produktion av näringsämne åt bakterien, utan dessa kan ersättas av vilka gener som helst. T-DNA:t behöver inte ens sitta på Ti-plasmiden utan kan sitta på en separat plasmid vilket förenklar uppbyggnaden av nya genkonstruktioner avsevärt (Lee & Gelvin, 2008). Bevan (1984) visade detta genom konstruktionen av en binär vektor, en plasmid innehållande T-DNA med selektionsgener för växter. Den binära plasmiden konstrueras och multipliceras i *Escherichia coli* för att sedan föras över till *A. tumefaciens* för transformation med hjälp av en desarmerad Ti-plasmid. Den desarmerade Ti-plasmiden saknar generna för tumörinduktion och näringsämnessyntes och innehåller därmed endast *vir*-generna.

Idag finns det ett stort antal binära vektorer i vilka det aktuella T-DNA:t kan modifieras med nya gener. Vektorernas egenskaper varierar med olika selektionsmekanismer, antibiotikaresistens och sekvenser för restriktionsenzym vilket gör att valet av vektor kan göras utifrån det aktuella användningsområdet (Lee & Gelvin, 2008).

2.2 Agroinfiltrering och tillfälligt uttryck

För att föra in T-DNA i sin värdväxt måste *A. tumefaciens* komma i direkt kontakt med levande celler, i naturen sker detta genom öppna sår. I kontrollerade försök är denna skada inte önskvärd vilket har lett till utvecklandet av olika tekniker för att föra in bakterierna i växten (Taiz & Zeiger, 2010). För att undvika de arbetskrävande momenten vid transfektion av protoplaster kan vakuum användas för att få bakterierna i kontakt med de inre cellagren i hela växter eller blad. Tekniken kan användas både för att erhålla transgen avkomma och för att ge ett transient, det vill säga tillfälligt, genuttryck i vegetativ vävnad (Bechtold et al., 1993). Ursprungligen utvecklades vakuuminfiltrering för stabil transformation av *Arabidopsis thaliana* men har idag använts med framgång på ett stort antal olika växtslag (Chumakov & Moiseeva, 2012). Den transienta transkriptionen, som är flera storleksordningar vanligare än stabil transformation där T-DNA:t integreras i värdens genom, uppkommer av att T-DNA förs in i cellen och uttrycks (Kapila et al., 1997). För att underlätta bakteriernas tillträde till cellerna används ofta en surfaktant som sänker ytspänningen. Det har visats att surfaktanten spelar en avgörande roll för en hög effektivitet vid vakuuminfiltrering (Clough & Bent, 1998). Då transkriptionen av T-DNA påminner om förloppet vid en virusinfektion, det vill säga uttryckandet av främmande gener, kan växten reagera på samma sätt och förhindra uttrycket på RNA-nivå. För att undvika detta kan en virusderiverad hämmare av denna mekanism användas. Genen p19 från Tomato bushy stunt virus är allmänt använd och ökar det transienta genuttrycket i *N. benthamiana* med uppåt femtio gånger (Lombardi et al., 2009).

2.3 CRISPR/Cas9

Utnyttjandet av det bakteriella försvarssystemet CRISPR/Cas inom biotekniken bygger på dess stora anpassningsbarhet. Systemet fungerade ursprungligen som ett ständigt växande vaccinationsbibliotek mot virus, varje gång ett nytt virus attackerar en bakterie sparas en kort sekvens från virusets genom. Vid en ny virusattack jämförs de sparade sekvenserna med genomets hos det attackerande viruset och vid överensstämmelse klyvs virusets arvsmassa vid de matchande sekvenserna (Barrangou et al., 2007; Jinek et al., 2012).

Ett första steg till utnyttjandet av detta system för modifiering av eukaryota genom kom 2012 då Jinek et al. (2012) undersökte funktionaliteten hos CRISPR/Cas typ II, ett av de tre system som det idag bedrivs omfattande forskning kring. Detta system bygger på tre komponenter: virushärlett CRISPR-RNA (crRNA), en RNA-sekvens komplementär till crRNA (tracrRNA) och själva proteinkomplexet Cas9 vilket binder in specifikt till en DNA-sekvens komplementär till crRNA:t i närvaro av tracrRNA (se bild 1A). Tas tracrRNA bort förlorar Cas9 sin specificitet vilket visar behovet av en delvis dubbelsträngad RNA-guide. För att CRISPR/Cas-komplexet ska kunna skilja främmande DNA från det egna används en kort sekvens, endast ett par baser lång, kallad protospacer adjacent motif (PAM). Denna sekvens sitter nedströms på den icke-komplementära DNA-strängen i direkt anslutning till den sekvens som crRNA:t basparar med vilket förenklar sökandet efter klyvningsställen. Istället för att leta efter alla sekvenser som kan baspara med crRNA:t är det endast sekvenser som ligger i anslutning till den artspecifika PAM-sekvensen som är aktuella (Künne et al., 2014).

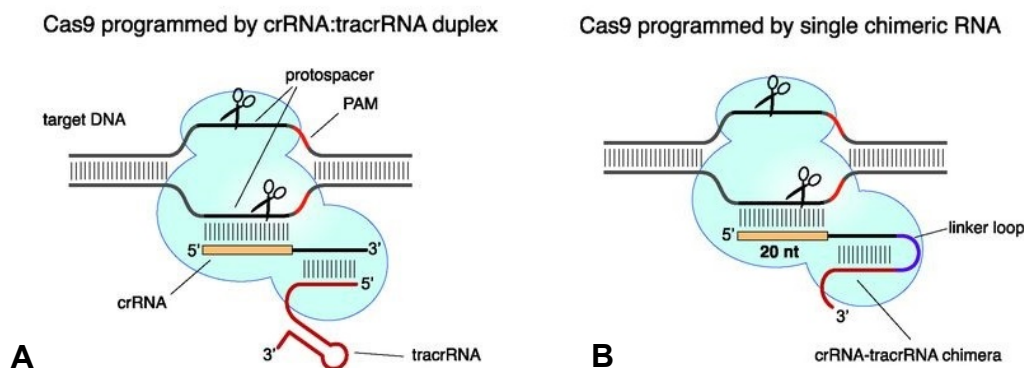


Bild 1: CRISPR/Cas9. Det ursprungliga komplexet **A** består av tre delar där crRNA tillsammans med tracrRNA styr var Cas9 ska klyva. **B** visar hur en designad enkelsträngad RNA-guide bibehåller funktionen. Från Jinek et al. (2012).

I sin undersökning om CRISPR fortsatte Jinek et al. (2012) med att titta på hur systemet kunde modifieras till att användas för riktad mutation. En förutsättning för detta är att specificiteten bibehålls även utanför bakteriella system. Detta undersöktes genom att designa en RNA-guide som, via en hårnålsstruktur, basparar med sig själv (se bild 1B). På detta vis kopieras den funktionella strukturen hos den dubbelsträngade crRNA:tracrRNA-guiden. *In-vitro*-undersökningar på både plasmid-DNA och dubbelsträngat DNA har visat att systemet klyver specifikt utifrån en designad enkelsträngad RNA-guide. Samma resultat har även erhållits med ett antal eukaryota organismer (Sampson & Weiss, 2013).

3. Material och metod

Grunden för detta arbete var undersökandet av det transienta genuttryck som fås via agroinfiltration av en genkonstruktion för bildandet av grönt fluorescerande protein (GFP) i *N. benthamiana* och potatis cv. Kuras. Genom att jämföra fluorescensens omfattning under olika infiltrationsförutsättningar kunde optimala parametrar tas fram vilka sedan användes vid infiltration av en CRISPR/Cas-konstruktion.

3.1 Förberedande av bakteriestammar

3.1.1 Kompetensgörning

Det första steget var att kompetensgöra stammar av *A. tumefaciens*. Detta gjordes genom att de fyra stammarna GV3101, EHA105, AGL-0 och AGL-1 inokulerades till varsitt 50 ml-rör innehållandes 5 ml LB-medium. Stammarna inkuberades under natten i 28°C, 230 rpm. Följande dag togs 800 µl från kulturerna till nya rör, 20 ml LB-medium i varje. Till dessa tillsattes antibiotika (rifampicin till 50 mg/l), och bakterierna inkuberades i 28°C, 230 rpm. Efter 5 timmar, när OD₆₀₀ nått ca. 1,0, kompetensgjordes bakteriestammarna för att kunna ta upp plasmid-DNA. Detta gjordes genom centrifugering, borthällning av supernatant och uppslamning av bakteriepellett i iskall sterilfiltrerad 0,01M CaCl₂. Stammarna delades upp till fyra eppendorfrör, 100 µl i varje, för att sedan frysas i flytande kväve och sparas i -80°C.

3.1.2 Direkt transformation

Ett rör av varje bakteriestam togs upp och tinades på is. 1,5 µl, motsvarandes ca. 1 µg, av den binära vektorn pCW498 35S GFIP ocs tillsattes till stammarna vilka sedan genomgick transformation vid 37°C i 5 minuter och hölls därefter vid 28°C, 1000 rpm under 2,5 h. Efter denna tid centrifugerades rören i 2 minuter, supernatanten hälldes bort och bakterierna uppslammades i 100 µl LB-medium för att sedan fördelas på LB-agarplattor, två per stam. Plattorna innehöll antibiotika (rifampicin och spectinomycin, 50 mg/l) för att selektera för resistensen som finns dels i det genomiska DNA:t och dels i den binära vektorn. Plattorna inkuberades i 28°C under två dagar.

Efter två dagar togs kolonier från plattorna till LB-medium (5 ml med rif. och spec. 50 mg/l) i 50 ml rör. Två kolonier från varje stam togs till varsitt rör och inkuberades i 28°C, 230 rpm under natten. Följande dag gjordes bakteriestockar genom att ta 850 µl från varje rör till ett 2 ml rör och sedan tillsätta 350 µl sterilfiltrerad glycerol/LB 30% (v/v). Rören frystes i flytande kväve och sparades sedan i -80°C. Innan frysning extraherades den binära vektorn från bakterierna (Thermo Scientific: GeneJet Plasmid Miniprep Kit) och undersöktes genom klyvning med hjälp av restriktionsenzymen *XbaI* och *BglII*.

3.2 Vakuuminfiltrering

För att hitta de optimala parametrarna för vakuuminfiltrering gällande sammansättning av infiltrationsmedium, ålder på planta, tid, tryck och upprepningar genomfördes flera försök. Då variablerna var så pass många kunde alla kombinationer inte undersökas utan parametrarna valdes utifrån resultaten från de föregående försöken. Grunden för infiltrationsmediet var 5% sackaros, 10 mM MES och 200 µM acetosyringon, pH 5,6.

Tabell 1: Behandlingar av <i>N. benthamiana</i> vid vakuuminfiltrering					
	Mg-källa	Silwet L-77	Plantålder	Vakuumtid	Undertryck
Behandling 1	MgCl ₂ (10 mM)	0,04%	3 veckor	3 min	600 mbar
Behandling 2	MS (1x)	0,04%	4 veckor	3 min	150 mbar
Behandling 3	MS (1x)	0,04%	4 veckor	3 min	300 mbar
Behandling 4	MS (1x)	0,04%	4 veckor	3 min	450 mbar
Behandling 5	MgCl ₂ (10 mM)	0,04%	5 veckor	2x1 min	150 mbar
Behandling 6	MgCl ₂ (10 mM)	0,04%	5 veckor	5 min	-
Behandling 7	MgCl ₂ (10 mM)	-	3 veckor	1 min	450 mbar
Behandling 8	MgCl ₂ (10 mM)	-	3 veckor	3 min	450 mbar
Behandling 9	MgCl ₂ (10 mM)	-	3 veckor	5 min	450 mbar

Tabell 2: Behandlingar av potatis cv. Kuras vid vakuuminfiltrering					
	Mg-källa	Silwet L-77	Vakuumtid	Undertryck	Annat
Behandling 10	MgCl ₂ (10mM)	0,04%	3+7 min	600 mbar	-
Behandling 11	MS (1x)	0,04%	10 min	600 mbar	-
Behandling 12	MgCl ₂ (10mM)	0,04%	10 min	600 mbar	+/- rispat blad + cv. Désirée

Dagen innan infiltrering sattes *A. tumefaciens*-stammar bärandes pCW498 35S GFIP ocs samt stammen GV3101 med en binär vektor som kodar för p19 (Wood et al., 2009) för uppodling. I ett 50 ml rör tillsattes 10 ml LB-medium och antibiotika för selektion vilket sedan inokulerades och inkuberades under natten i 28°C, 230 rpm. På infiltrationsdagen inducerades bakteriernas virulens genom tillsats av 10 µl acetosyringon (100 mM). 2-3 timmar senare centrifugerades rören i 5 minuter i rumstemperatur, supernatanten hölldes bort och bakterierna slammades upp i 5 ml infiltrationsmedium. OD₆₀₀ mättes sedan för att beräkna volymen bakterier som krävdes för att nå 50 ml, OD₆₀₀ = 0,2. Den beräknade volymen tillsattes till ett 50 ml rör vilket sedan fylldes upp till 50 ml med infiltrationsmedium. Vid infiltration av *N. benthamiana* blandades de GFP-bärande stammarna och GV3101 p19, båda med OD₆₀₀ = 0,2. Potatis infiltrerades både med och utan GV3101 p19.

Bakterielösningarna hölldes upp i petriskålar, 80 mm i diameter. De ovanjordiska delarna av växthusodlad *N. benthamiana*, 3-4 veckor gamla, eller potatis odlad *in-vitro* placerades sedan i skålarna som sattes ner i en exsickator. Önskat undertryck erhöles med hjälp av en vakuumpump, detta tryck hölls under en bestämd tid för att sedan hastigt släppas. Vid behov upprepades infiltreringen. Efter utförd infiltrering togs plantorna upp och sköljdes i sterilt vatten och placerades sedan i sitt odlingsmedium igen och återbördades därefter till respektive odlingsrum.

Som kontroll av metoden vid infiltreringen av CRISPR/Cas9-konstruktionen användes även spruta för att föra in bakterierna i 6 veckor gamla plantor av *N. benthamiana*.

Bakteriedensiteten var densamma, OD₆₀₀ = 0,2, och infiltrationsmediet bestod av 5 mM MES och 5 mM MgCl₂.

3.3 Dokumentation av GFP-uttryck

Uttrycket av GFP dokumenterades under 14 dagar med hjälp av Bio-Rad VersaDoc MP 4000. Plantorna sattes in och fotograferades en och en, dels med vitt ljus med ett klart filter (exponeringstid 25 sekunder) och dels med blått ljus med ett grönt filter (530BP) (exponeringstid 180 sekunder).

3.4 Sekvensering av målsekvens

Sekvensen som sgRNA:t designades för att binda till är en del av ett exon i genen för granulbundet stärkelsesyntas (*GBSS*) i *N. benthamiana*. För detektion och analys av den mutation som CRISPR/Cas9-komplexet introducerar extraherades DNA från modersorten och infiltrerade plantor av *N. benthamiana* (Qiagen DNeasy Plant Kit) vilket sedan amplifierades med polymerase chain reaction (PCR) (Thermo Scientific: Phusion High-Fidelity DNA Polymerase, forward primer: TCAACTGGATGAAGGCTGGGATA, reverse primer: TTGTCAGTTGCTGGGTTCCA). Efter kontroll av det amplifierade fragmentets storlek med 1% agaros-gelelektrofores ligerades fragmentet till vektorn pJET1.2/blunt (Thermo Scientific: CloneJET PCR Cloning Kit) varpå vektorn transformerades till kompetenta *E. coli* (Invitrogen: One Shot TOP10 Coli Chemically Competent *E. coli*) som efter inkubering i 1 h, 37°C 250 rpm, ströks ut på agarplattor (+ carbenicillin 50 mg/l). Plattorna inkuberades vid 37°C över natten.

Kolonier plockades dagen efter från plattorna och inokulerades till varsitt 15 ml rör med 5 ml LB + carb. (50 mg/l) och inkuberades under natten, 37°C 250 rpm. Dagen efter extraherades plasmid-DNA (Thermo Scientific: GeneJet Plasmid Miniprep Kit) från de sex rören och efter en koncentrationsmätning späddes proverna till 17 µl, 80 ng/µl för att sedan skickas på sekvensering (Eurofins Genomics).

4. Resultat

4.1 Transformation av *A. tumefaciens*

A. tumefaciens-stammarna AGL-0, AGL-1, EHA105 och GV3101 tog upp plasmiden pCW498 GFIP ocs (bild 2A) vilket kan ses på klyvningsmönstret på bild 2B. Fragmentens storlek överensstämmer med de förväntade efter klyvning med *Xba*I och *Bgl*III.

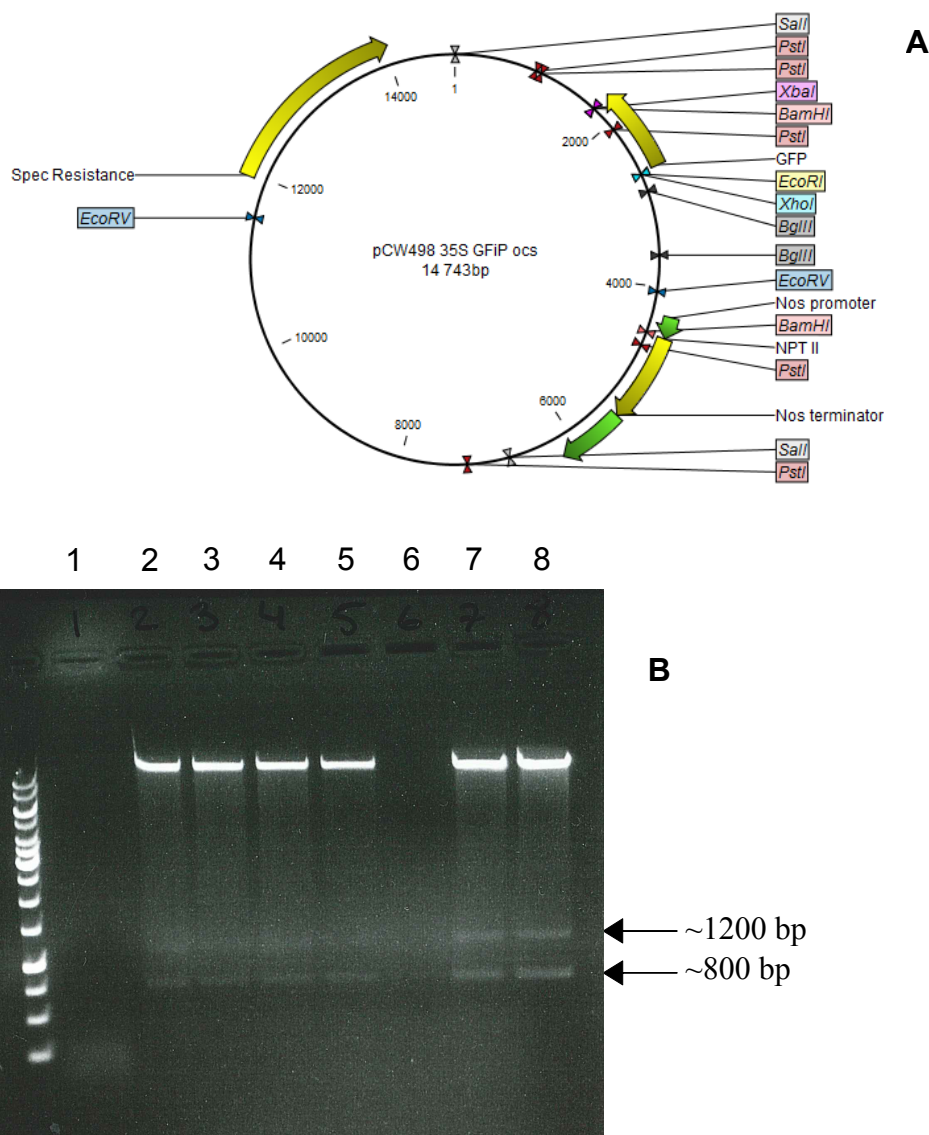


Bild 2: **A:** Den binära vektorn pCW498 GFIP ocs. **B:** Gelelektrofores efter klyvning av pCW498 GFIP ocs från *A. tumefaciens* med restriktionsenzymen *Xba*I och *Bgl*III. Bana 1-2: AGL-0, bana 3-4: AGL-1, bana 5-6: GV3101, bana 7-8: EHA105. Thermo Scientific GeneRuler 1kb DNA Ladder används som referens.

4.2 Undersökning av målsekvens

4.2.1 PCR av målsekvens i *N. benthamiana*

PCR på isolerat DNA från modersorten av *N. benthamiana* med efterföljande gelelektrofores bekräftade amplifieringsprodukten teoretiska storlek (bild 3A) på 184 bp vilket ses på bild 3B.

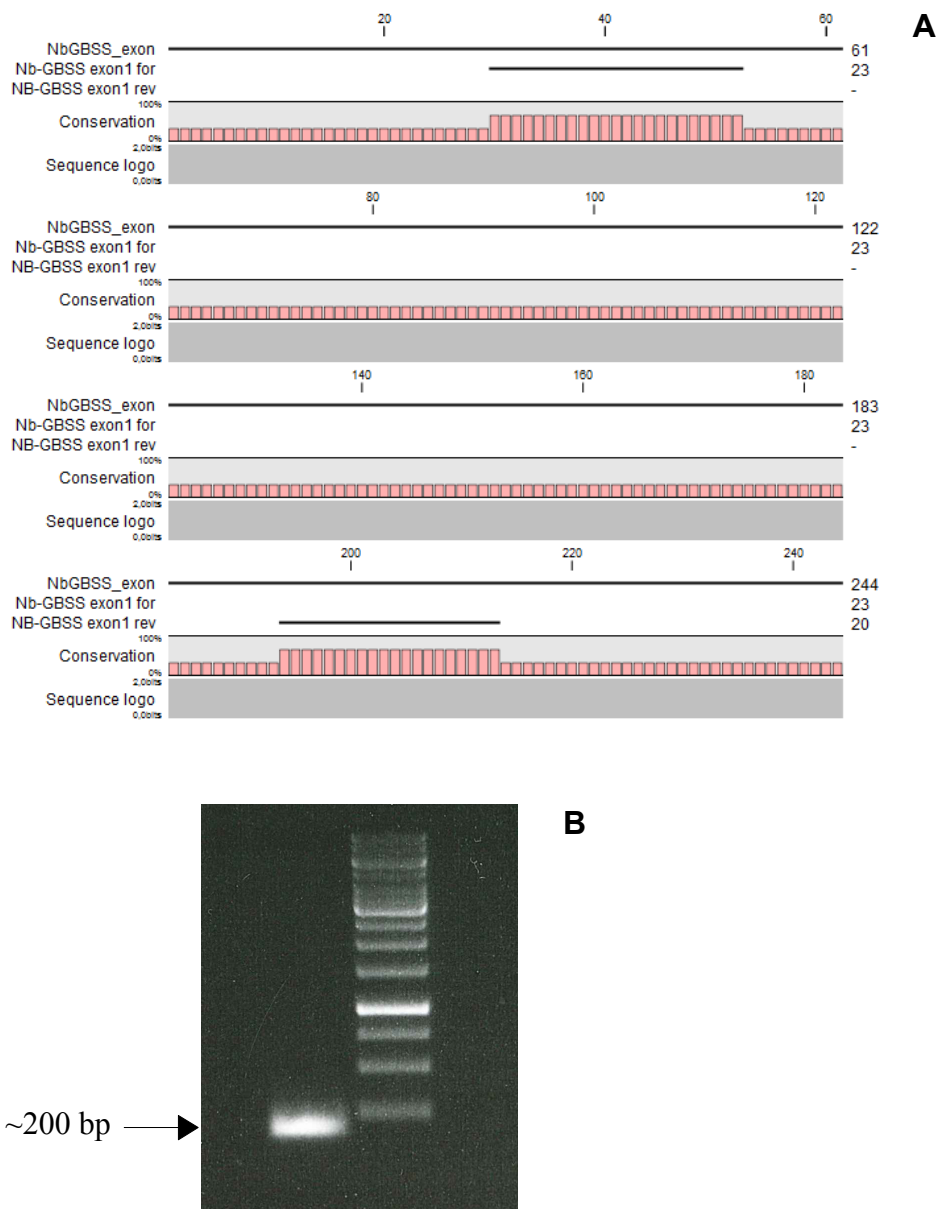


Bild 3: A: Den sekvens i *GBSS* som amplifierades. B: Gelelektrofores av PCR-produkt efter amplifiering av sekvens i *GBSS* från modersort av *N. benthamiana*. Thermo Scientific Gene Ruler 1kb DNA Ladder används som referens.

4.2.2 Sekvensering av målsekvens i *N. benthamiana*

För att undersöka vilken typ av mutation som CRISPR/Cas9 introducerar togs sex prover från en obehandlad planta av *N. benthamiana* för jämförelse. Dessa prov amplifierades genom PCR och transformerades till *E. coli*. Efter plasmidextraktion skickades proverna för sekvensering och det visade sig att proverna grupperades i två grupper med tre prov i varje. Sammanlagt skiljde det sex baser mellan grupperna i den ~185 bp långa sekvensen (bild 5). Se bilaga 1 för detalj på skillnaden.

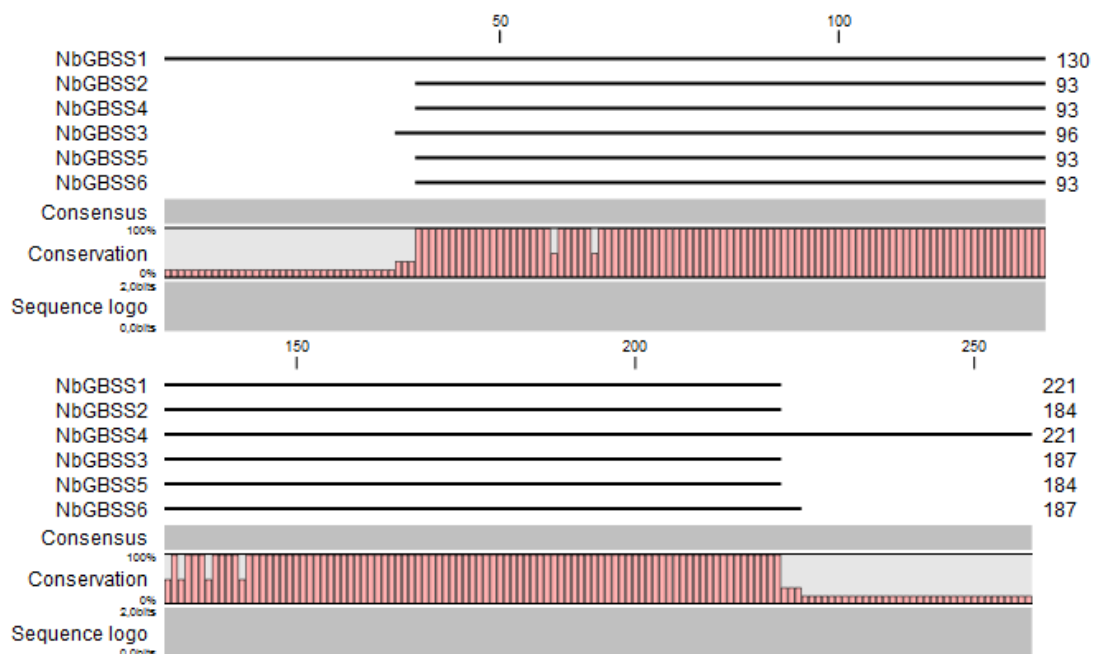


Bild 5: Konsensus mellan de sex proverna sånär som på 6 baser.

4.2.3 PCR av behandlade plantor av *N. benthamiana*

För att undersöka amplifieringsprodukternas storlek efter PCR på DNA isolerat från plantor infiltrerade med CRISPR/Cas9-konstruktioner genomfördes gelelektrofores. Denna visade ytterst svaga och otydliga band av den förväntade storleken (bild 4). Av denna anledning användes inte dessa amplifieringsprodukter för ligering och transformation utan nytt växtmaterial togs från infiltrerade områden, frystes i flytande kväve och sparades i -80°C för senare användning.

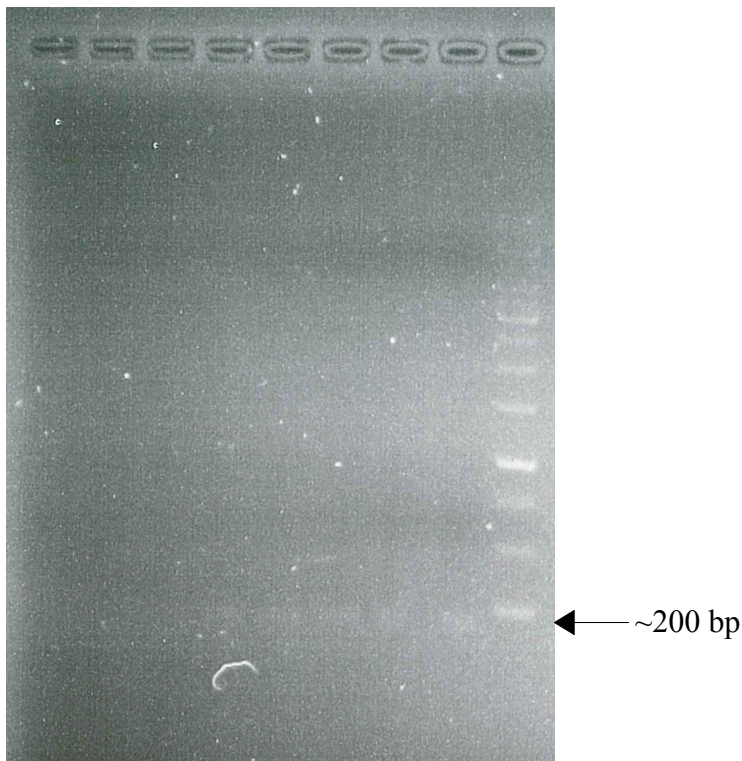
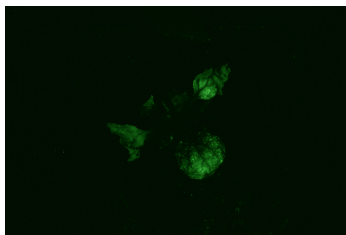

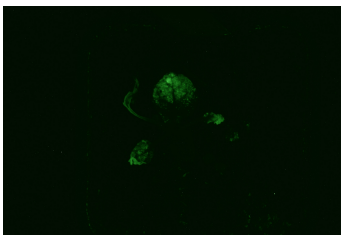
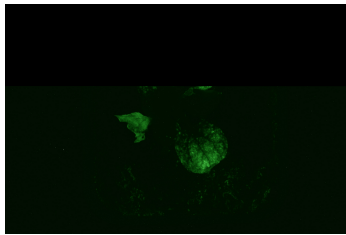
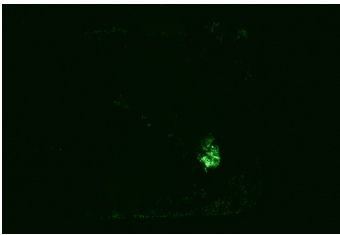
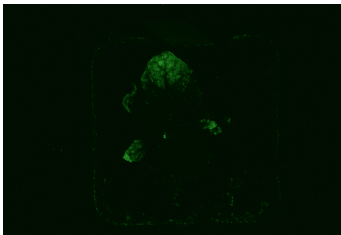
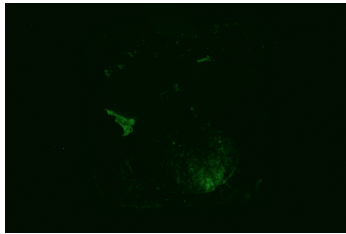
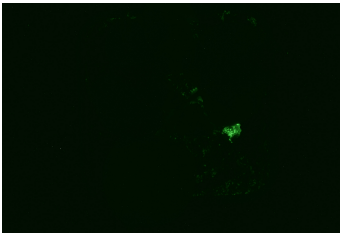
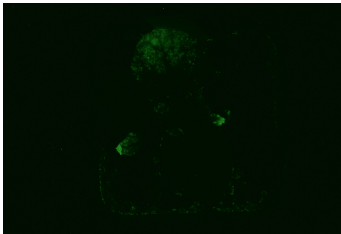
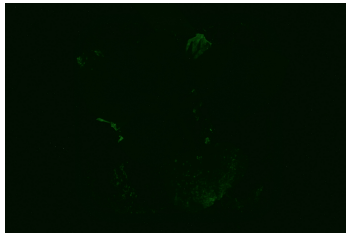
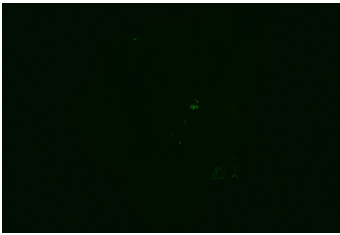
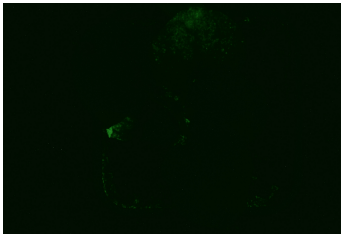


Bild 4: Gelelektrofores av PCR-produkt efter amplifiering av sekvens i *GBSS* från infiltrerade plantor. Thermo Scientific GeneRuler 1kb DNA Ladder används som referens.


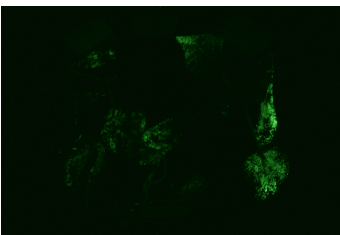
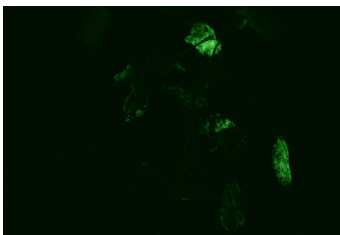
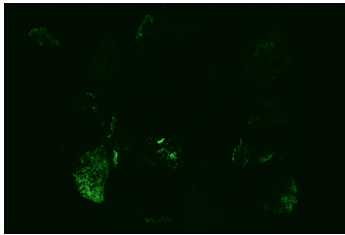
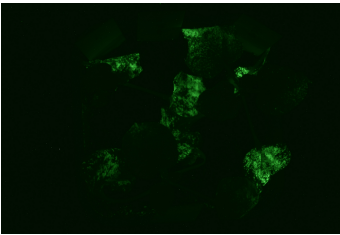
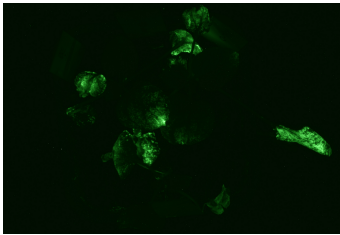
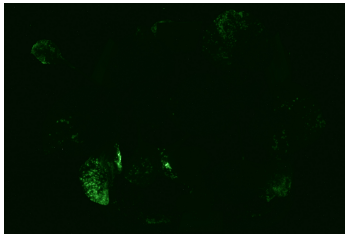
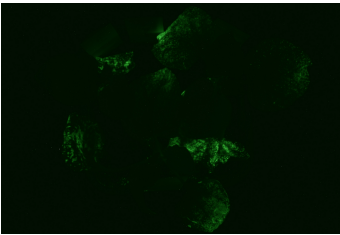
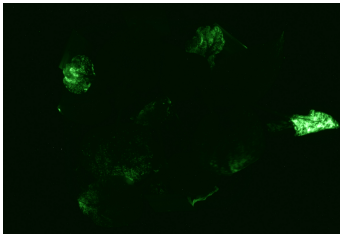
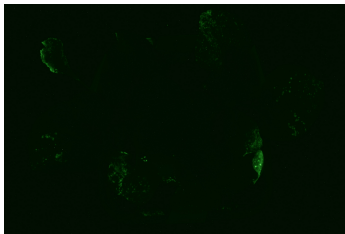
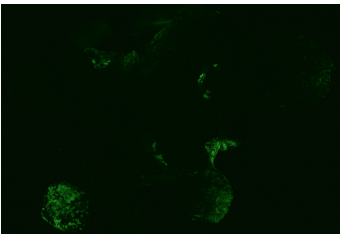
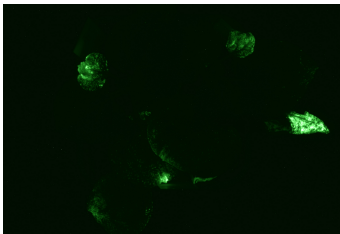
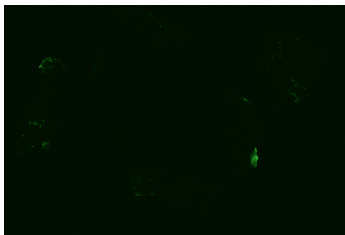
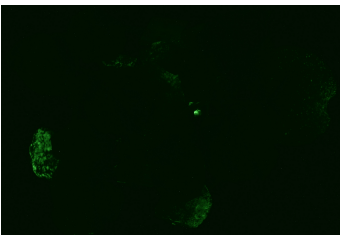
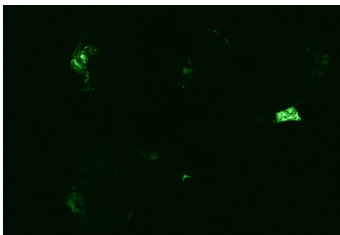
4.3 GFP-uttryck vid olika behandlingar

4.3.1 *N. benthamiana*

De olika behandlingarna jämfördes utifrån mängden fluorescens och de infiltrerade bladens överlevnad. Resultatet från första infiltrationen, som kan ses i tabell 3, visade att metoden fungerade för *N. benthamiana* men att parametrarna, 3 minuter vid 600 mbar, behövde justeras. De infiltrerade bladen dog kort efter infiltrationen medan blad som utvecklades efter infiltrationen uppvisade fluorescens. Av de tre stammarna av *A. tumefaciens* uppvisade AGL-1 minst fluorescens medan dödligheten var oberoende av stam.

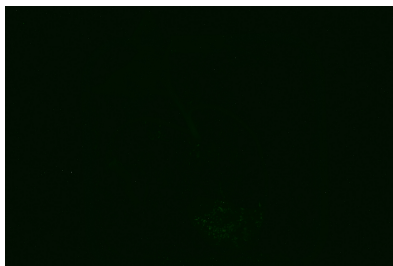
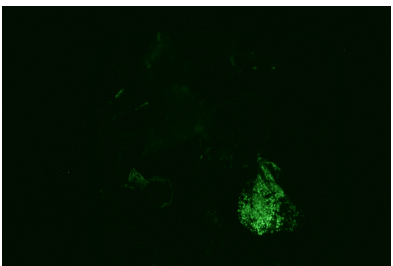
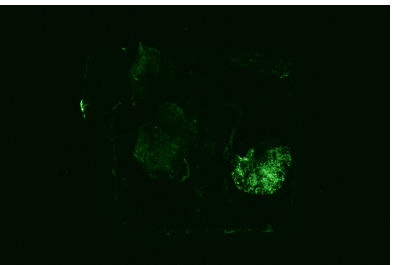
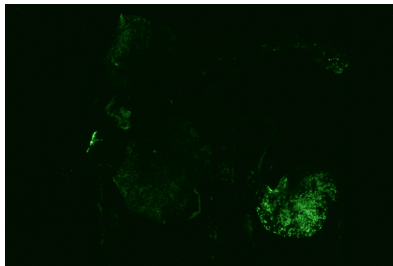
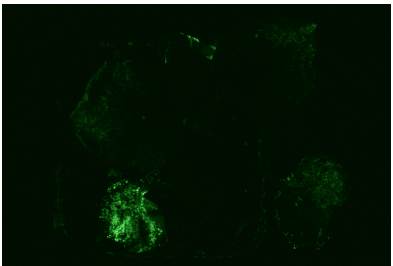
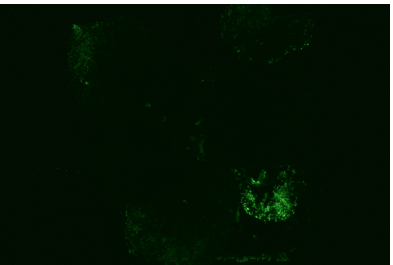
Tabell 3: Behandling 1. Bilderna visar hela plantor uppifrån			
	AGL-0	AGL-1	GV3101
Dag 6			
Dag 9			
Dag 12			
Dag 14			

Sambandet mellan dödlighet och undertryck undersöktes genom att variera undertrycket vid de tre följande behandlingarna, 150, 300 respektive 450 mbar användes under 3 minuter. De tre försöken, som visas i tabell 4, visade att dödligheten var oberoende av undertrycket, även vid den lägsta nivån dog de infiltrerade bladen. Däremot gav ett ökande undertryck mer fluorescens. Skillnaden mellan stammarna som sågs vid föregående behandling återfanns ej.

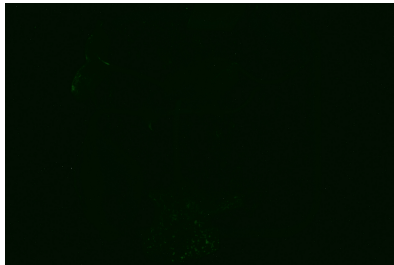
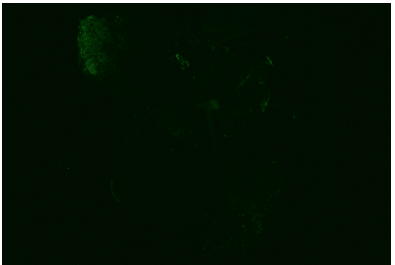
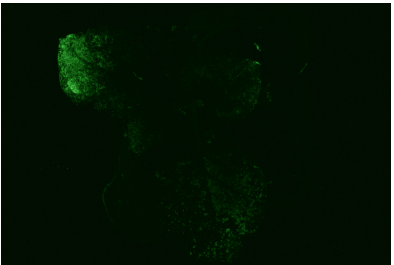
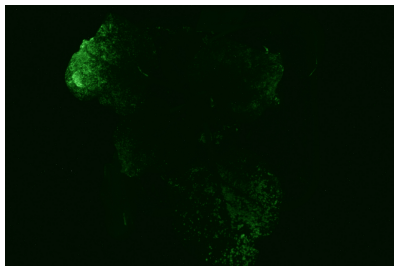
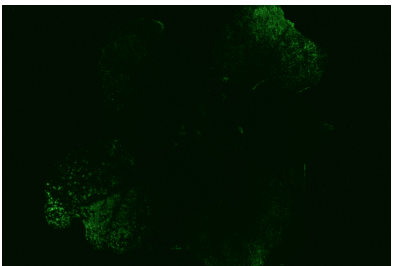
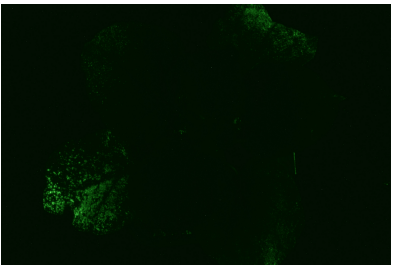
Tabell 4: Behandling 2-4. Bilderna visar tre hela plantor uppifrån.			
	3 min 150 mbar	3 min 300 mbar	3 min 450 mbar
Dag 4			
Dag 7			
Dag 10			
Dag 12			
Dag 14			

För att undersöka om dödligheten berodde på undertrycket i sig, oavsett storlek, genomfördes ett försök, behandling 6, helt utan undertryck under 5 minuter. Detta jämfördes med


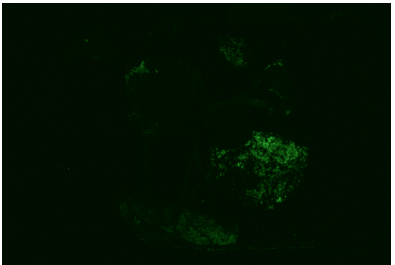
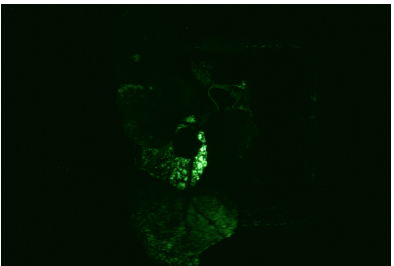
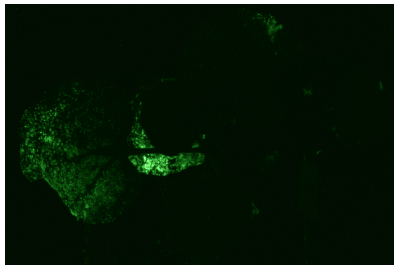
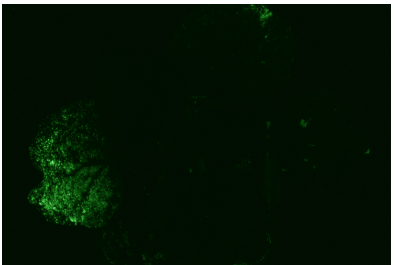
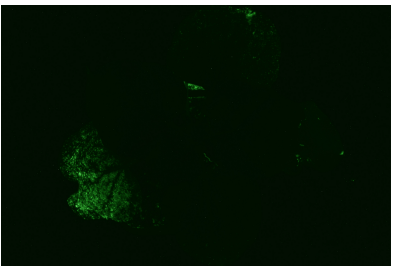
behandling 5 där plantorna utsattes för ett litet undertryck, 150 mbar, under 2x1 minut. Det var stor skillnad i överlevnad mellan behandlingarna där plantorna utsatta för undertryck under kortare tid var i bättre skick. Även när det gällde fluorescens var skillnaden markant, de plantor som bara doppades uppvisade inte någon fluorescens alls (inga bilder) medan de som utsattes för undertryck fluorescerade oavsett bakteriestam (tabell 5-8). Graden av fluorescens varierade dock något där GV3101 gav det lägsta uttrycket.


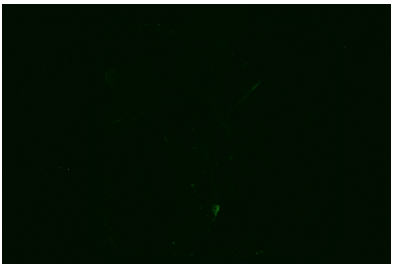
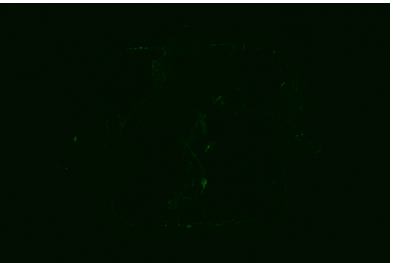
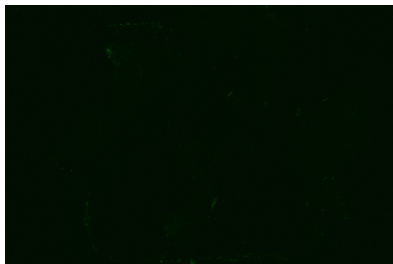
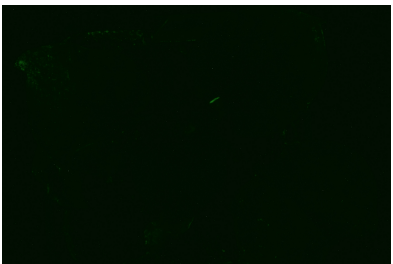
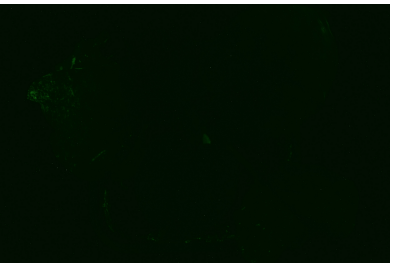
Tabell 5: Behandling 5. Bilderna visar hela plantor uppifrån		
AGL-0		
Dag 2	Dag 5	Dag 7
		
Dag 9	Dag 12	Dag 14
		

Tabell 6: Behandling 5. Bilderna visar hela plantor uppifrån

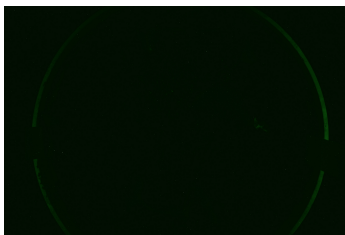
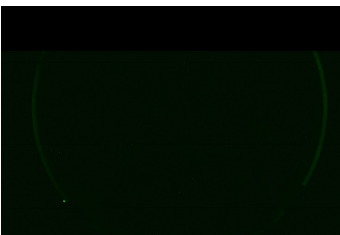
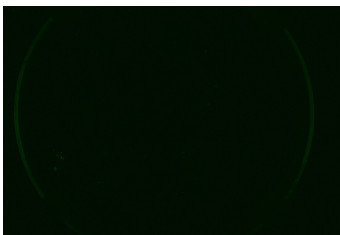
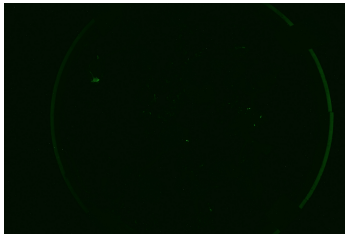
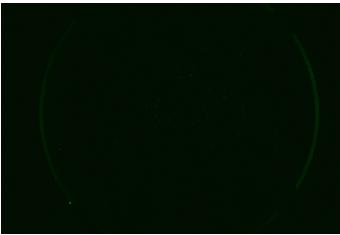
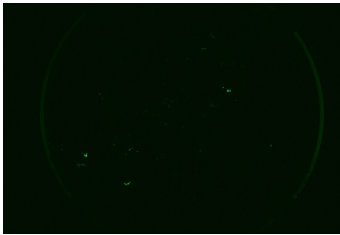
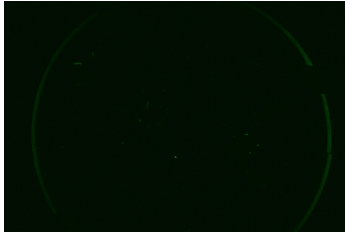
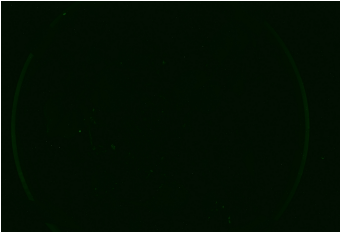
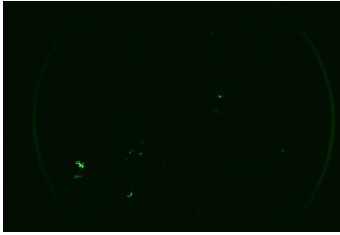
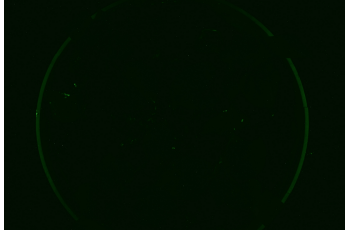
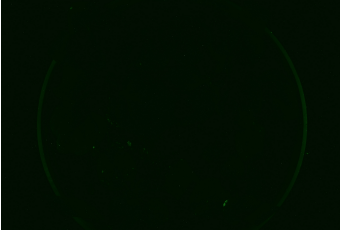
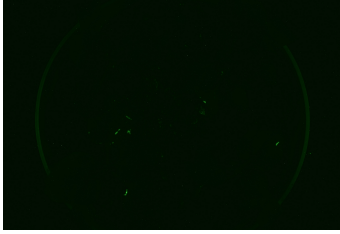
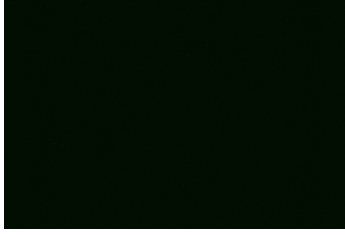


AGL-1		
Dag 2	Dag 5	Dag 7
		
Dag 9	Dag 12	Dag 14
		

Tabell 7: Behandling 5. Bilderna visar hela plantor uppifrån

EHA105		
Dag 2	Dag 5	Dag 7
		
Dag 9	Dag 12	Dag 14
		

Tabell 8: Behandling 6. Bilderna visar hela plantor uppifrån		
GV3101		
Dag 2	Dag 5	Dag 7
		
Dag 9	Dag 12	Dag 14
		

På grund av den höga dödligheten som enbart doppning gav genomfördes tre försök vid 450 mbar utan Silwet L-77 vid olika tider, 1, 3 respektive 5 minuter. Resultatet, som kan ses i tabell 9, visade att frånvaron av Silwet L-77 gav nästintill helt opåverkade plantor utan varken några klorotiska eller nektrotiska områden. Det krävdes dock 5 minuter för att över huvud taget få väldigt svag och lokaliserad fluorescens.

Tabell 9: Behandling 7-9. Bilder tagna uppifrån, fyra plantor per kruka.			
	1 min 450 mbar	3 min 450 mbar	5 min 450 mbar
Dag 2			
Dag 5			
Dag 7			
Dag 9			
Dag 12			

Då överlevnaden var betydligt högre vid frånvaron av Silwet L-77 halverades den ursprungliga halten till 0,02% vid infiltrationen av CRISPR/Cas9-konstruktionen. Detta gav en högre överlevnad än tidigare försök med Silwet L-77 men de infiltrerade bladen slokade

fortfarande. I övrigt var infiltrationsmediet det samma som i föregående försök, 10 mM MgCl_2 , 10 mM MES, 200 μM AS och 5% sackaros. *A. tumefaciens* GV3101 användes för infiltration av både GFiP och CRISPR/Cas9-konstruktionen.

4.3.2 Potatis

Trots upprepade försök med olika Mg-källor, med och utan p19 och med rispade blad visade potatis aldrig någon fluorescens, varken Kuras eller Désirée. Överlevnaden av infiltrerade blad var dock betydligt högre än hos *N. benthamiana* trots både högre undertryck och längre tid.

5. Diskussion

5.1 GFP-uttryck

5.1.1 *N. benthamiana*

5.1.1.1 Tid, dödlighet och Silwet L-77

Det är svårt att ge ett entydigt svar gällande de bästa förutsättningarna för uttryck av GFP i *N. benthamiana* då de infiltrerade bladen i stor utsträckning dör. Anledningen till detta är troligtvis en kombination av, i huvudsak, tid och halten av Silwet L-77. Skillnaden på plantornas fysiska status var markant när tiden förlängdes. De som i behandling 6 endast legat i infiltrationsmediet i 5 minuter var i sämre skick ett par dagar efter infiltrationen och hade en längre återhämningsperiod, uppåt 10 dagar mot cirka 7 dagar för plantorna som i behandling 5 utsatts för undertryck under 2x1 min.

Även när det gäller det fluorescerande GFP-uttrycket gav enbart doppling under 5 minuter sämre resultat då dessa plantor helt saknade fluorescens under undersökningstiden. Dessa resultat stämmer överens med de som Joh et al. (2005) kom fram till, det tillfälliga uttrycket är betydligt högre när vakuum används. De visade även att användningen av surfaktant gynnar uttrycket men bara till en viss nivå, överskrids denna dör vävnaden. Detta blev tydligt vid de behandlingar där Silwet L-77 uteslöts, överlevnaden var betydligt högre hos infiltrerade blad och de förlorade varken turgor eller utvecklade nekrotiska fläckar. Dock var fluorescensen ytterst svag även vid det högsta undertrycket, 450 mbar. Behovet av surfaktant för erhållandet av ett högre tillfälligt genuttryck är etablerat hos flera olika arter som till exempel tomat (Ekengren et al., 2003), lök (Xu et al., 2014), hybridasp (Takata & Eriksson, 2012), *Piper colubrinum* (Mani & Majula, 2011) och *Anthurium andraeanum* (Hosseini et al., 2012).

5.1.1.2 Undertryck

Medan dödligheten delvis kan vara korrelerad med kontakttiden kan uttrycket av GFP vara kopplat till hur stort undertryck som använts. Vid behandling 2-4 varierades undertrycket medan kontakttiden med bakterielösningen hölls konstant och under de två veckorna som

plantorna följdes visade det sig att när undertrycket ökade steg även graden av fluorescens. Detta sammanfaller med de resultat Simmons et al. (2008) redovisar, större undertryck driver ut mer luft ur bladen vilket ökar möjligheten för bakterielösningen att tränga in. Detta ökar i sin tur sannolikheten för kontakt mellan bakterierna och växtcellerna.

Dock nås en gräns för undertryckets storlek, vid 450 mbar ökar graden av fluorescens men även graden av nekrotiska områden. Vid behandling 1 var detta ännu tydligare, vid 600 mbar dog de infiltrerade bladen snabbt medan fluorescens kunde noteras hos nybildade blad som inte infiltrerats. Detta kunde tydligast ses vid infiltration med stammarna GV3101 och AGL-0. Troligtvis beror fluorescensen i nytillväxta blad på att tillväxtpunkten infiltrerats och de bladanlag som då fanns bar med sig *A. tumefaciens* från början. GFP-uttrycket är hos dessa starkast i de unga bladspetsarna men intensiteten avtar efterhand som bladet växer. Avtagandet kan, utöver tystandet av den transienta expressionen (Lombardi et al., 2009), bero på två saker, antingen är bakteriernas tillväxthastighet lägre än bladets eller så minskar bakteriernas förmåga till införsel av T-DNA. Eftersom de stammar av *A. tumefaciens* som används för infiltration har en desarmerad Ti-plasmid producerar inte växten de näringsämnen som bakterien behöver. Dessa suboptimala näringsbetingelser kan hämma tillväxthastigheten. Den andra möjligheten kan förklaras av Kapila et al. (1997), nämligen icke-inducerade *vir*-gener. Infiltration av *A. tumefaciens* helt i avsaknad av acetosyringon producerade betydligt lägre transient uttryck än när acetosyringon fanns med i både infiltrationsmediet och i delar av tillväxtfasen.

5.1.1.3 Stam av *A. tumefaciens*

Trots den stora spännvidden över de olika behandlingarna har GFP-uttrycket mellan de olika stammarna av *A. tumefaciens* varierat relativt lite vilket gör det svårt att dra några slutsatser för vilken stam som är bäst vid infiltration av *N. benthamiana*. Skillnaderna har inte varit konsekventa mellan de olika behandlingarna och med den höga dödligheten av infiltrerade blad krävs det fler försök för att se några tydliga mönster. Alternativt har stammen inte någon betydelse för det transienta uttrycket under de förutsättningar som använts.

5.1.2 Potatis

Frånvaron av fluorescens visar att potatis fortsätter vara ett svårarbetat växtslag för erhållandet av ett transient uttryck (Bhaskar et al., 2009). Trots att de blad som utsattes för undertryck tydligt var mättade av bakterielösning är detta uppenbarligen inte tillräckligt, någonting hindrar det transienta uttrycket. I behandling 12 rispades blad i ett försök till skada cellerna för att på så sätt underlätta tillträdet för bakterier till cellerna. Detta fungerar vid stabil transformation av potatis, kallus bildas då vid de skadade områdena från vilket stabilt transformerade celler kan tas (De Block, 1988).

Transient uttryck är möjligt att erhålla i potatis, Jones et al. (1989) visade det med protoplaster och Bhaskar et al. (2009) visade det med hjälp av agroinfiltrering. Att båda systemen fungerar visar, tillsammans med att rispning av bladen inte gav något transient uttryck, att cellväggen inte utgör någon fysisk barriär. En alternativ förklaring kan vara att det i potatis finns en mekanism som hindrar det transienta uttrycket, trots närvaron av p19. Enligt Bhaskar et al. (2009) spelade uttrycket av p19 inte någon roll för det transienta uttrycket vilket kan innebära att det krävs en annan form av hämmare av det virala försvarssystemet.

5.2 Gruppering av sekvenser

Uppdelningen av de sekvenserade proverna i två grupper pekar på närvaron av två alleler för *GBSS*, något som förklaras av dess diploida genom (Goodin et al., 2008). Skillnaderna mellan allelerna är viktiga att känna till, både antal, läge och typ, för att dessa inte ska förväxlas med effekter från CRISPR/Cas9. Skillnaderna i sig spelar inte någon roll så länge samma allel jämförs från en behandlad och obehandlad planta.

7. Referenser

Barrangou, R. et al. (2007). CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. *Science*, vol. 315, ss. 1709-1712.

Bechtold, N. et al. (1993). *In planta Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Sciences de la vie/Life sciences*, vol. 316, ss. 1194-1199.

Belhaj, K. et al. (2013). Plant genom editing made easy: targeted mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/Cas system. *Plant Methods*, vol. 9:39.

Bevan, M. (1984). Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Research*, vol. 12, ss. 8711-8721.

Bhaskar, P. B. et al. (2009). *Agrobacterium*-Mediated Transient Gene Expression and Silencing: A Rapid Tool for Functional Gene Assay in Potato. *PLOS ONE*, vol 4:6.

Chumakov, M. I. & Moiseeva, E. M. (2012). Technologies of *Agrobacterium* Plant Transformation *In planta. Applied Biochemistry and Microbiology*, vol. 48, ss. 657-666.

Clough, S. J. & Bent, A. F. (1998). Floral Dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, vol. 16, ss. 735-743.

De Block, M. (1988). Genotype-independent leaf disc transformation of potato (*Solanum tuberosum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Theoretical and applied Genetics*, vol. 76, ss. 767-774.

Ekengren, S. K. et al. (2003). Two MAPK cascades, NPR1, and TGA transcription factors play a role in Pto-mediated disease resistance in tomato. *The Plant Journal*, vol. 36, ss. 905-917.

Goodin, M. M. et al. (2008). *Nicotiana benthamiana*: Its History and Future as a Model for Plant-Pathogen Interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, vol. 21, ss. 1015-1026.

Hosein, F. N. et al. (2012). Optimization of an *Agrobacterium*-mediated Transient Assay for Gene Expression Studies in *Anthurium andraeanum*. *Journal of the American Society of*

Horticultural Science, vol. 137, ss. 263-272.

Jinek, M. et al. (2012). A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science*, vol. 337, ss. 816-821.

Joh, L. D. et al. (2005). High-Level Transient Expression of Recombinant Protein in Lettuce. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 91:7.

Jones, H. et al. (1989). Transient gene expression in electroporated *Solanum* protoplasts. *Plant Molecular Biology*, vol. 13, ss. 503-511.

Jobling, S. (2004). Improving starch for food and industrial applications. *Current Opinion in Plant Biology*, vol. 7, ss. 210-218.

Kapila, J. et al. (1997). An *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Science*, vol. 122, ss. 101-108.

Künne, T. et al. (2014). Planting the seed: target recognition of short guide RNAs. *Trends in Microbiology*, vol. 22, ss. 74-83.

Lee, L.Y. & Gelvin, S. B. (2008). T-DNA Binary Vectors and Systems. *Plant Physiology*, vol. 146, ss. 325-332.

Li, J.F. et al. (2013). Multiplex and homologous recombination-mediated genom editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nature Biotechnology*, vol. 31, ss. 688-691.

Lombardi, R. et al. (2009). High-level HIV-I Nef transient expression in *Nicotiana benthamiana* using the p19 gene silencing suppressor protein of Artichoke Mottled Crinkle Virus. *BMC Biotechnology*, vol. 9:93.

Mani, T. & Manjula, S. (2011). Optimization of *Agrobacterium*-mediated transient gene expression and endogenous gene silencing in *Piper colubrinum* Link. by vacuum infiltration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, vol. 105, ss. 113-119.

Sampson, T. R. & Weiss, D. S. (2013). Exploiting CRISPR/Cas systems for biotechnology. *Bioessays*, vol. 36, ss. 34-38.

Shan, Q. et al. (2013). Targeted genom modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology*, vol. 31, ss. 686-688.

Simmons, C. W. et al. (2009). A Model of *Agrobacterium tumefaciens* Vacuum Infiltration Into Harvested Leaf Tissue and Subsequent In Planta Transgene Transient Expression. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 105:3.

Taiz, L. & Zeiger, E. (2010) *Plant Physiology*. 5 ed. Sunderland: Sinauer Associates, Inc

Takata, N. & Eriksson, M. E. (2012). A simple and efficient transient transformation for hybrid aspen (*Populus tremula* x *P. trmuloidea*). *Plant Methods*, vol. 8:30.

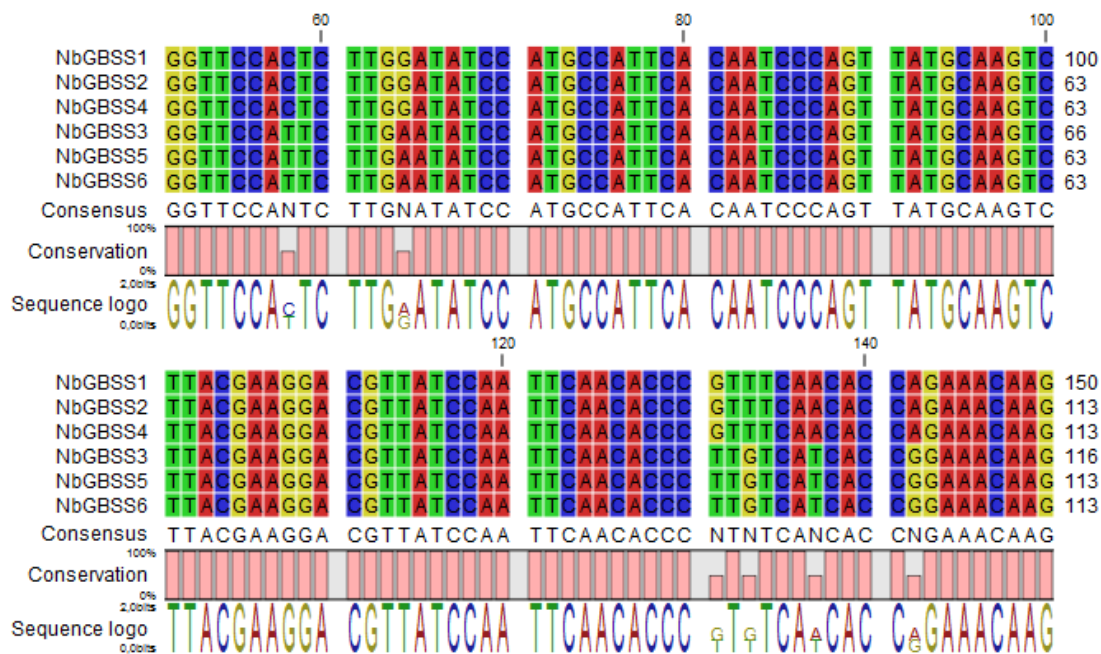
Visser, R. G. F. et al. (1989). Molecular cloning and partial characterization of the gene for granule-bound starch synthase from a wildtype and an amylose-free potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Science*, vol. 64, ss. 185-192.

Wood, C. C. et al. (2009). A leaf-based assay using interchangeable design principles to rapidly assemble multistep recombinant pathways. *Plant Biotechnology Journal*, vol. 9, ss. 914-924.

Xu, K. et al. (2014). A Rapid, Highly Efficient and Economical Method of *Agrobacterium*-Mediated *In Planta* Transient Transformation in Living Onion Epidermis. *PLOS ONE*, vol. 9:1.

Bilagor

Bilaga 1: Skillnader i sekvenser från modersort av *N. benthamiana*



Bilaga 1: Del av sekvens av GBSS från *N. benthamiana*. Skillnader på sex positioner.